

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16130

研究課題名(和文)ペルオキシソーム接触領域を形成する因子の同定と生理機能の解析

研究課題名(英文)Identification of the novel factor of peroxisomal contact sites using a proximity labeling system

研究代表者

山本 真寿(Yamamoto, Masatoshi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：70802114

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文): 真核細胞内に存在するオルガネラは、独自の機能に特化したコンパートメントであるとともに、他のオルガネラと協調的に働くことで正常な細胞機能を発揮している。このオルガネラ間コミュニケーションに重要な場としてオルガネラ同士が物理的に近接した近接領域(コンタクトサイト)が近年注目されている。その一方で、この近接領域を単離精製するのは技術的に困難であり、形成する分子機構については不明な点が多く残されている。

本研究ではオルガネラ近接領域にタンパク質を標的化する手法を確立し、これを応用することでペルオキシソームと小胞体の近接領域に存在するタンパク質の特異的な標識に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、細胞生物学における近年のトピックのひとつである「オルガネラ・ゾーン」研究これまでににおいて、これまで技術的に困難であったオルガネラ近接領域の単離精製を可能にする技術の確立に成功した。本研究ではペルオキシソームと小胞体の近接領域をモデルに実証を行ったが、原理的には様々なオルガネラ近接領域に応用可能であると考えられる。今後、様々なオルガネラ近接領域の形成機構解明に重要な役割を果たす事が期待される。

研究成果の概要(英文): Eukaryotic cells contain various organelles compartmentalized by the intracellular membrane to maintain their identity and specialize biological processes. These organelles are not only individual entities but also communicated between other organelles to perform their appropriate function. Such inter-organelle communication is achieved by vesicular trafficking and membrane contact sites. However, the molecular mechanism to form membrane contact sites is not fully understood.

In this study, we established the in situ protein labeling method for peroxisomal membrane contact sites using modified engineered ascorbate peroxidase (APEX2). Moreover, this method could apply to the isolation of other membrane contact sites, and it will be a powerful tool for future "Organelle zone" research.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オルガネラ コンタクトサイト ペルオキシソーム 小胞体 オルガネラゾーン

1. 研究開始当初の背景

真核細胞内に存在する細胞内小器官（オルガネラ）は、それぞれが独自の生理機能に特化した細胞内コンパートメントであるとともに、他のオルガネラと物質や情報をやり取りし協調的に働くことで正常な細胞機能を発揮していることが示されている。一方で、オルガネラ間は親水的な環境である細胞質と疎水的環境である生体膜によって隔てられていることから、効率的に物質の輸送を行う仕組みが必要であり、従来研究が進められてきた「小胞輸送」に加えて「オルガネラ近接領域」がその仕組みを担う場として注目されている。

オルガネラ近接領域はオルガネラが数 10 nm 程度に近接した領域で、オルガネラ同士が物理的に近接することにより、イオンや脂質分子など様々な物質の輸送を効率的に行う機能を持っていると考えられている。これらオルガネラ接触領域は、各々のオルガネラ膜に存在するタンパク質複合体がオルガネラを繫留することによって形成・維持されていると考えられており、実際に小胞体とミトコンドリア間の近接領域についてはその形成因子が明らかにされつつある。その一方で、他のオルガネラ近接領域については存在こそ報告されているものの、形成因子についてはほとんど明らかにされていない。この問題は、多くの近接領域については単離精製する手法が未確立で解析が技術的に困難なことに起因しており、オルガネラ近接領域の普遍的な精製法の開発が求められていた。

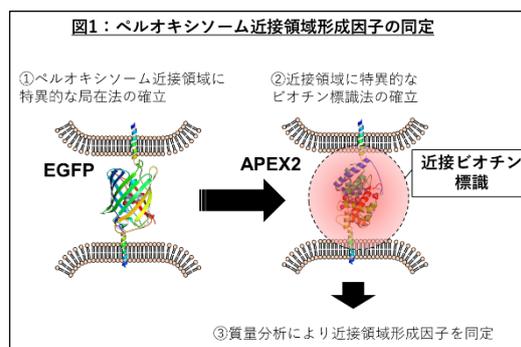
2. 研究の目的

本研究では、これまで明らかにされていないオルガネラ近接領域の形成因子の同定を目指し、その基盤となるオルガネラ近接領域の普遍的な精製法の開発を行う。具体的には、いまだ不明な点が多く残されているペルオキシソームと他のオルガネラとの近接領域に注目し、生細胞においてペルオキシソーム近接領域を標識する手法の開発と、その手法を利用してペルオキシソーム近接領域を形成する分子の同定を試みた。

3. 研究の方法

これまでに研究代表者らは、哺乳類細胞において小胞体-ミトコンドリア近接領域を特異的にビオチン標識し、その近接領域の形成に関与する分子を見出している（未発表）。本研究ではこの手法を応用し、まずペルオキシソーム近接領域に特異的な標識法の確立を試みた。

まずは、蛍光タンパク質（EGFP）に、ペルオキシソーム局在化配列と膜貫通配列、それ以外のオルガネラに対する局在化配列と膜貫通配列を融合したタンパク質を複数種作製し、効率的に EGFP を近接領域に局在させる配列の組み合



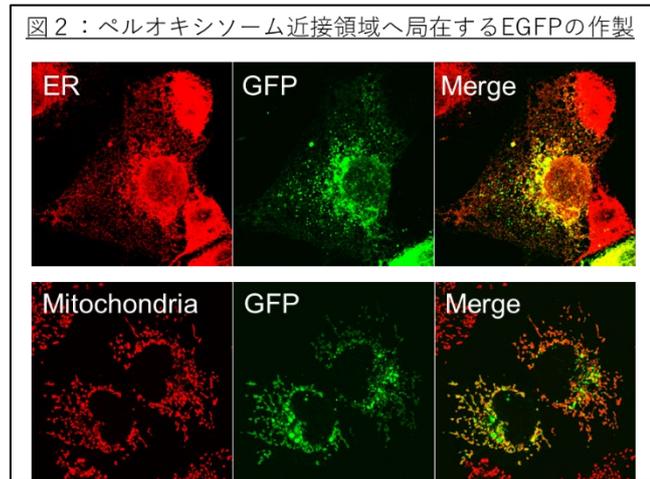
わせを選定した（図1）。選定した配列の組み合わせを植物に由来する改変型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ（APEX2）に適応し、哺乳類細胞において APEX2 をペルオキシソーム近接領域に局在させることができるかを検討した。構築したペルオキシソーム近接領域局在型の APEX2 については、実際に生細胞においてビオチン近接標識反応を行い、ペルオキシソーム近接領域が特異的に標識されるか検討した。

4. 研究成果

（学術論文公表前のため、以下は公表可能な情報のみ公開するものとする）

4-1. ペルオキシソーム近接領域に特異的な局在を示す配列の同定

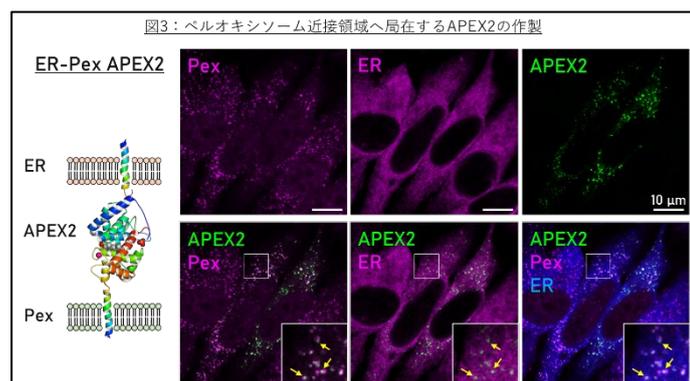
まず種々のペルオキシソーム膜タンパク質から、ペルオキシソーム膜への局在化に必要なシグナル配列及び膜貫通配列をクローニングするとともに、小胞体・ミトコンドリア・核・細胞膜の各オルガネラ膜タンパク質からも局在配列と膜貫通配列をクローニングし、図1に示すような EGFP との融合タンパク質を総当たりに作製した。多くの組み合わせでは片方のオルガネラのみ局在を示す結果が得られたが、EGFP の N 末端側に小胞体膜局在化配列を融合し、C 末端側にペルオキシソーム膜局在化配列を融合したコンストラクト及び、N 末端側にペルオキシソーム膜局在化配列、C 末端側にミトコンドリア外膜局在化配列を融合したコンストラクトでは、小胞体あるいはミトコンドリアの一部への特異的な局在が見られた（図2）。



これら二つのコンストラクトについて小胞体やミトコンドリア及びペルオキシソームマーカータンパク質との蛍光免疫染色を行ったところ、ドット状の局在を示す EGFP はいずれのオルガネラマーカーとも部分的な一致を示していることから、作製したコンストラクトはいずれもペルオキシソーム近接領域へ強く局在していることが示唆された（図2）。

4-2. ペルオキシソーム近接領域特異的に標的化した APEX2 タンパク質の構築

同定したペルオキシソーム近接領域特異的な局在を呈する局在化配列を改変型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ（APEX2）に融合し、ペルオキシソーム近接領域に特異的な局在を示すか検討した。前項の検討において、ペルオキシソーム近

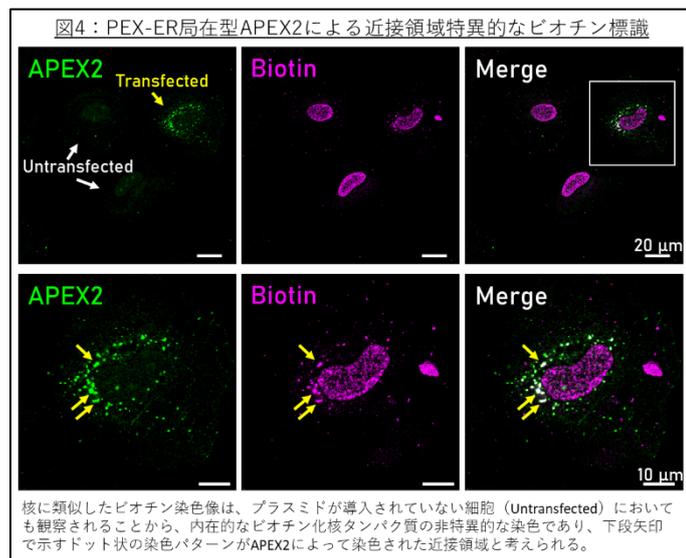


接領域に、より特異的な局在を示したペルオキシソーム-小胞体近接領域へ標的化したコンストラクトを用いた。この局在化配列を APEX2 タンパク質に融合することによって、APEX2 も EGFP と同様に細胞中でドット状の局在パターンを示すことが明らかとなった（図 3）。共焦点顕微鏡による局在解析から、APEX2 が局在する位置には小胞体マーカータンパク質及びペルオキシソームマーカータンパク質も存在することから作製した APEX2 タンパク質は、ペルオキシソームと小胞体の近接領域に局在することが示唆された（図 3）。

4-3. APEX2 を用いたペルオキシソーム-小胞体近接領域に特異的なビオチン標識法の確立

構築したペルオキシソーム-小胞体近接領域に標的化した APEX2 タンパク質を用いて、生細胞における近接領域特異的なビオチン標識を行った。APEX2 はビオチン化反応の基質となるビオチンフェノールを細胞に取り込ませた後に、過酸化水素を加えることにより APEX2 の周囲数 10 nm に存在するタンパク質を網羅的にビオチン標識することができる。HeLa 細胞にペルオキシソーム-小胞体近接領域に標的化した APEX2 を発現させ、近接ビオチン化反応を誘導した。

その結果、細胞内にドット状に局在した APEX2 の近傍が特異的にビオチン標識されていることが蛍光標識ストレプトアビジンによって検出することができた（図 4）。この結果から、当初の計画通りにペルオキシソームが形成する近接領域を特異的に標識する新規手法を確立することができたと考えられる。



4-4. 総括及び今後の展望

本研究では生きた哺乳動物細胞において、特にペルオキシソームと小胞体が形成する近接領域に存在するタンパク質を、特異的かつ網羅的に標識する新規手法を確立することに成功した。本研究終了時点において、ペルオキシソームと小胞体の近接領域を特異的に標識する手法については報告されていない。本研究で確立した手法はペルオキシソームだけでなく様々オルガネラ間近接領域について適用可能であると考えられ、オルガネラ同士のコミュニケーションを解析する強力なツールとなることが考えられる。その一方で、当初計画していたペルオキシソーム近接領域を形成する因子の同定は本研究期間中には至らなかった。この原因として当初予想していた以上に局在化配列の選定・最適化に時間を要したこと、質量分析研究者との円滑な連携が取れなかった点が考えられる。今後は、本研究課題によって確立した手法を用いてペルオキシソームと小胞体の近接領域を形成するタンパク質を同定し、この近接領域が持つ生理的な意義の解明に迫りたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masatoshi Yamamoto, Masaya Yamazaki, Tomoya Yamaguchi
2. 発表標題 Identification of the novel components of ER-Mitochondria contact sites using proximity labeling system
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会（2019年6月24日 神戸）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masatoshi Yamamoto, Tomoya Yamaguchi
2. 発表標題 Identification of the novel factor of ER-Mitochondria contact site using proximity labeling system
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会（2020年6月11日 オンライン開催）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------